

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
G01N 33/543

(45) 공고일자 1990년07월30일
(11) 공고번호 특1990-0005486

(21) 출원번호	특1987-0701191	(65) 공개번호	특1988-0701380
(22) 출원일자	1987년12월14일	(43) 공개일자	1988년07월26일
(86) 국제출원번호	PCT/US 87/000876	(87) 국제공개번호	W0 87/06346
(86) 국제출원일자	1987년04월15일	(87) 국제공개일자	1987년10월22일

(30) 우선권주장	86-1695-3	1986년04월15일	스웨덴(SE)
(71) 출원인	씨트룩스 바이오폴 리미티드 테리저 다블류 에어즈 미합중국 조오지아주 30092 노어크로스 테크놀로지 파아크 웨이 150		
(72) 발명자	거스타프 멧츠 랜비 스웨덴왕국 904 41 우메아 비올로지 그랜드 10 닐즈 아르비드 버그스도르프 스웨덴왕국 910 20 호네포스 아스프바겐 14		
(74) 대리인	차윤근, 차순영		

심사관 : 이정우 (책자공보 제1968호)

(54) 고상 분석 방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

고상 분석 방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 43개의 혈장 샘플속에서 ELISA 방법으로 t-PA를 측정하는 중의 측정결과를 비교한 도면이다. 각 샘플에 대하여, 세 측정 웰속에 150 µL의 PBS-트윈(0), 150 µL의 10mg/l 정상 IgG(N) 및 150 µL의 10mg/ml 항-t-PA IgG(A)를 샘플 배양단계중에 미리 충전시키고서 측정하였다. 같은 샘플의 결과들은 선으로 연결되어 있다.

[발명의 상세한 설명]

[기술분야]

본 발명은 면역학적 고상(solid phase)방법으로 항원을 검출하는 고상 분석 분야에 관한 것이다.

[발명의 배경]

면역학적 고상 방법을 이용하여 특정 항원을 측정하거나 분석할 경우 고상은 이 항원에 대한 항체로 피막처리를 할 수 있다. 이는 종종 플라스틱 관의 내부 또는 플라스틱 평판내의 웰 위에 항체를 물리적으로 흡착시킴으로써 이루어질 수 있다(기술 문헌상에는 '피막처리'라는 용어사용). 항원을 함유한 시험용액을 이러한 관 또는 웰 속에 집어 넣으면, 항원은 흡착된 항체와 선택적으로 결합한다(항체-항원 반응).

이후, 관 또는 웰을 비우고 철저히 세척을 할 수 있다. 이러한 방식으로, 표면에 존재하는 항체는, 그가 존재하고 있던 매트릭스(매질)로부터 검출 및 정량을 수행할 수 있는 곳인 훨씬 더 쉽게 취급되는 고상으로 전달될 수 있다. 공지된 ELISA 방법을 이용할 경우, 항원에 대항하는 추가의 항체를 사용하여 이것이 수행된다. 이 항체는 양 고추냉이 과산화효소(HRP) 또는 알카리 포스파타제 같은 효소로 표지를 붙일수 있다. 효소-표지(효소-접합) 항체를 관 또는 웰 속에 집어 넣으면 벽이나 표면에 존재하는 항원과 결합된다. 과잉량의 효소-표지 항체를 씻어내리고, 남아 있는 효소-표지 항체를, 착색 생성물로 전환되는 효소 기질로 검출한다.

전술한 ELISA 기술의 변형으로는 여러가지가 있으나 원칙은 동일하다. 이론상으로는 단지 항원만이 그의 원래 매트릭스로부터, 항원이 균일하게 노출되는 곳인 표면으로 이동되어 분석을 쉽게 할 수 있게 된다.

실제로 시험 용액속에는 흡착된 항체에 결합하거나 몇몇 다른 기작에 의해서 고상에 직접 결합함으로써 이 표면에 결합되는 다른 성분들이 존재한다. 이같이 비-특이적으로 결합된 성분들은 수행하고자 하는 분석을 방해하고, 그릇되게 포지티브(positive)하거나 그릇되게 높은 측정결과를 초래하기 때문에 이 방법에 있어서의 오차의 중대한 원인이 된다. 전통적인 ELISA 기술에 있어서, 고상에 결합되는 샘플내 비-항원 성분들은 효소-접합 항체를 흡수할 수 있어서, 그릇되게 높은 측정결과를 제공해준다. 이러한 비-항원 개재 측정결과는 비특이적 흡수로부터 나온 결과일 것이라고 믿어진다.

정성 분석(예: 샘플내에 항체 또는 항원의 존재 또는 부재에 대한 것만을 알아보는 시험)에 있어서, 비특이적 효과에 기인한 상승된 분석반응은 그릇된 포지티브 결과를 야기한다. 분석의 식별 수준을 높임으로써 그릇된 포지티브 효과를 감소시키려는 시도는 그릇된 네가티브 결과의 수를 증가시킬 것이다. 이처럼 이러한 분석에 있어서의 비특이적 효과는 진단상의 불확실성 문제를 일으킨다.

이전의 기술들은 비특이적 흡수(또는 결합)를 최소로 감소시키고자 하는 시도였었다. 예컨대 고상의 표면을 철저하게 '봉쇄(blocking)하여' 이것이 부가적인 성분들을 흡수하지 못하도록 하였다. 또한 불활성 항체를 효소첨가에 의해 분리해내고 항원-결합 분류물((Fab)₂-단편)을 분리하여 고상위에 부동화시켰었다. 그러나 이러한 기술로는 전적인 성공이 성취되지 못하였다. 더우기 ELISA 기술을 이용함에 있어서의 난점들이 최근 증가추세로 주목되고 있다. 예컨대 가프니일행의 1984년도 문헌[Thromb. Haemostas, 52(1):96-97]과 보스카토 일행의 1986년도 문헌[Clin. Chem., 32(8):1491-1495]을 참고하라.

[발명의 요약]

본 발명에 따라, 첫번째 고상 및 두번째 고상을 항원-특이성 항체로 피막처리하는 단계를 포함하는, 샘플내 항원 검출을 위한 개선된 방법이 제공된다. 이어서, 첫번째 고상은 첫번째 및 두번째 고상의 피막처리를 위해 사용된 것과 동일한 항원-특이성 항체 및 항원을 함유한 용액에다 노출시킨다. 두번째 고상은 비특이성 항체 및 항원을 함유한 용액에다 노출시킨다. 이어, 첫번째 고상에 결합된 항원 및 두번째 고상에 결합된 항원의 양을 당업자들에게 잘 알려진 방법에 의하여 측정한다. 샘플내 항원의 양을 정량하기 위하여, 두번째 고상에 결합된 항원의 양에서 첫번째 고상에 결합된 항원의 양을 빼준다.

샘플내 특별한 항원-특이성 상체를 측정하고자 하는 본 발명의 두번째 실시형태에 있어, 본 발명은 시험하고자 하는 항체에 대하여 특이성이 있는 항원으로 첫번째 고상 및 두번째 고상을 피막처리하는 단계를 포함한다. 이어, 첫번째 고상은 첫번째 및 두번째 고상을 피막처리하는데 사용된 것과 동일한 항원 및 항원 특이성-항체를 함유한 용액에 노출시킨다. 두번째 고상은 비-특이성 항원 및 항원-특이성 항체를 함유한 용액에다 노출시킨다. 그런다음, 첫번째 고상에 결합된 항체 및 두번째 고상에 결합된 항체의 양을 당업자들에게 잘 알려진 방법에 의하여 측정한다. 샘플내 항체의 양을 정량하기 위하여, 두번째 고상에 결합된 항체의 양에서 첫번째 고상에 결합된 항체의 양을 빼준다.

본 발명은 항원에 대해 분석하고자 하는 샘플을, 항원에 대항하는 항체로 피막처리된 고상에다 노출시켜 항원-항체 결합을 야기시킨후, 결합된 항원을 당업자들에게 잘 알려진 방법에 의해 검출 또는 측정하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 신규성은, 샘플내에서 가용성인 어떤 특별한 항체의 존재하에 이러한 노출을 수행함으로써 비특이성 흡착의 문제를 제거 혹은 감소시킨다는 예기치 않은 발견에 기초한 것이다. 효소 조직 플라스미노겐 활성화제(t-PA)에 대한 ELISA를 개발할때, 접합체(conjugate)의 비특이적 흡착의 문제를 해결하려는 시도에서, 본 출원의 발명자들은 첫번째 배양 단계, 즉 시험 샘플을 항체로 피막처리된 고상에다 노출시킬때의 가용성 항체의 효과를 조사하였다. 그 결과 본 발명자들은 다음과 같은 두가지의 중요한 관찰을 하였다.

1. 고상의 표면을 피막처리할 때 사용한 것과 동일한 특이성을 갖는 항-t-PA-항체가 비교적 낮은 농도라 할지라도 특이적인 t-PA 결과를 봉쇄하는데는 충분하였다. 예기되는 결과는, 액상(샘플의 상)내의 특이적 항체가 두 상(相)내 항체의 비교적인 양에 따라서 두 상 사이에 t-PA-항원을 분포시키리라는 것이다. 예컨대 항체 0.2 μ g을 고상과 관련시키고 항체 2 μ g을 액상과 관련시킨다면 항원은 고상과 액상 사이에서 각각 1:10으로 분포되어야 한다. 실제로 그 같은 경우의 분포도는 1:99이다. 이러한 발견은, 가용성 항체를 먼저 측정용 웰(또는 관)속에 집어넣은 후 샘플을 샘플관에다 첨가하는 방법을 허용해주는데, 이는 실제적인 관점에서 매우 매력적인 방법이다. 샘플을 용해된 항체로 사전 배양해야 한다면 이 방법은 보다 더 어렵게 될 것이다.

2. 면역을 시키지 않은 동물로부터 얻는 항체(소위 정상적인 항체)가 첫번째 배양시 포함될 경우, 혈장내 조직 플라스미노겐 활성화제(t-PA)가 ELISA 기술로 측정되었을때에 결과는 일반적으로 격하된다. 어떤 경우에는 감소율이 50% 이상이지만, 보통은 10% 정도이다. 45가지의 경우중 단지 한 경우에서만 그 같은 감소율이 탐지되지 않았다. 더 나아가, 감소율은 드문 경우에, 즉 소위 류마티스성 인자가 함유된 샘플속에서만 예기될 수 있었다.(첨가된 정상 항체 10 μ g/ml은 혈장 샘플로부터 나온 단백질 3000 μ g/ml에 의해 완전히 가리워지기 때문에 그같은 단백질의 효과는 예측되지 않았다.)

본 발명은 ELISA 기술과 같은 비경쟁성 면역학적 고상 방법에 특히 적절하다.[Engvall, 1980, Methods enzymol. 70A, 419-439 참조]. 본 발명은 비특이적 흡착의 문제에 대한 실질적이고 유용한 해결책을 제시해주며, 특정 분석 방법에서의 신뢰할만한 측정 혹은 분석 결과에 대한 가능성을 본질적으로 개선시키는 것으로 입증되었다.

따라서 본 발명의 한가지 목적은 그릇된 포지티브 값의 수를 크게 줄이거나 제거하는 개선된 분석법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은, 그릇되게 높은 값의 수를 크게 줄이거나 제거하는 개선된 분석법을 제공하는

것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 샘플내 항원-특이성 항체의 양을 정확하게 측정할 수 있는 개선된 분석법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 AIDS 바이러스에 특이성이 있는 항체의 양을 정확하게 측정하고 그릇된 포지티브 값의 수를 줄일 수 있는 분석법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 샘플내 조직 플라스미노겐 활성화제의 양을 정확하게 측정할 수 있는 분석법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 그릇된 포지티브 값의 수를 최소로 줄이는 정성 분석법을 제공하는 것이다.

본 발명의 이러한 목적 및 다른 목적들, 특징 및 장점은 본 명세서에 나와 있는 실시형태의 상세한 설명 및 첨부된 청구범위를 검토함으로써 자명해질 것이다.

[상세한 설명]

총 ELISA 반응인 R_{tot} 는 하기 세 부분이 종합된 것으로서 볼 수 있다:(a) 항원-특이성 부분 R_{Ag} :이것은 샘플에다 항원-특이성 면역글로블린을 첨가함으로써 퀸칭(quenching)될 수 있음.

(b) 항원-비특이성 부분:이것은 샘플에다 비면역 면역글로블린을 첨가함으로써 퀸칭될 수 있고, 따라서 면역글로블린-특이성 반응 R_{Ig} 이라고 불리워야 함.

(c) 비특이성 잔류 부분 R_{Ur} :면역글로블린에 의해 영향을 받지 않으며 면역글로블린의 존재와 무관함.

따라서,

$$R_{tot} = R_{Ag} + R_{Ig} + R_{Ur}.$$

샘플을 항원-특이성 항체가 들어 있는 마이크로-시험평판 웰('사전충전된 A'웰)에다 첨가하면, R_{Ag} 과 R_{Ig} 가 여기서 R_A 라 불리우는 반응으로부터 소거된다. 따라서 $R_A = R_{Ur}$. 면역시키지 않은 동물에서 얻은 항체가 들어 있는 웰('사전충전된 N'웰)에다 샘플을 첨가하면 여기서 R_N 이라 불리우는 반응으로부터 R_{Ig} 만이 소거된다: $R_N = R_{Ur}$. 그러므로 R_N 과 R_A 의 차는 분석 과정의 목적인 분석 반응의 항원-특이성 부분이다:

$$R_N - R_A = R_{Ag}.$$

그릇된 포지티브 결과가 나올 가능성은 현재 실시되고 있는 바와 같은 ELISA 기술이 본래 갖고 있는 것이다.

본 발명에 따른 방법을 사용하면 비-특이적 흡착을 간단한 방법으로 본질상 제거할 수 있게 된다.

본 발명은, 특이적 결합을 완전히 봉쇄하는 실제적인 방법을 발견했다는 점에서 이러한 문제를 해결하기 위한 이전의 시도들과는 차이가 있다. 샘플은 두가지 시스템속에서 배양한다. 한 시스템속에서는 결합을 선택적으로 봉쇄하지 않으며, 다른 시스템속에서는 선택적으로 결합을 봉쇄한다. 비-특이성 결합은 양쪽 시스템속에서 발현되며 특이성의 결과는 그 차로써 얻어진다.

본 발명을 수행함에 있어 세가지 항체 제제가 사용된다. 첫번째는 고상을 피막처리하기 위한 제제이고, 두번째 제제는 특이적인 측정 해독치를 봉쇄하기 위한 동일한 특이성을 갖는 것이고(이것은 피막처리용으로 사용된 것과 동일한 항체일 수 있다), 세번째 제제는 특이적 결과를 봉쇄하지 않는 것이다. 위의 두 항체 제제는 쌍(pair)으로 나타나며, 가능한한 서로 유사해야만 한다. 바람직하게는 이들이 한가지 성질, 즉 항원과 반응이라는 점에서만 차이를 나타낸다. 한 항체는 항원과 반응해야 하고(특이적), 또 다른 항체는 항원과 반응하지 않아야 한다(비특이적), 그러므로 항체들은 같거나 유사한 근원을 가져야 하고(예컨대, 이들은 같은 동물 종으로부터 유래되고, 둘다 같은 아족의 모노클론이거나 둘다 폴리클론임), 같거나 유사한 방법으로 제조되어야 한다.

본 발명에 따라, 그릇되게 높거나 포지티브한 측정결과와 연관된 난점들을 극복하기 위하여, 측정하고자 하는 항원이 함유된 샘플의 두 부분표본을 동일한 항-항원-항체로 피막처리된 표면을 갖는 두 고상에다 노출시킨다. 첫번째 노출작업(노출 1)은 고상에 피막처리되는 항체와 동일한 특이성을 갖는 항체가 샘플내에 존재하는 가운데 수행하며, 두번째 노출작업(노출 2)은, 바람직하게는 문제되는 항원에 대하여 특이성은 없으나 그외에는 노출 1의 샘플속에 존재하는 항체와 본질상 동일한 항체의 존재하에 수행하고, 노출 1에서 결합된 항원과 노출 2에서 결합된 항원사이의 분석 반응에 있어서의 차에 의하여 항원을 검출한다.

본 발명에 따른 방법은 주로 ELISA 유형의 비경쟁성 면역학적 고상 방법에 사용하고자 하는 것인데, 이는, 언급된 항체가 바람직하게는 면역글로블린이어야 한다는 것을 의미하기도 한다. 물론 이 방법은 주로 항원의 정량 측정을 위한 것이지만, 본 발명에 따른 방법은 분석의 불확실성이 너무 커서 정성 결과가 의문시되는 경우의 정성 분석에도 적합하다. 다시 말해서, 본 발명에서의 '검출'이라는 용어는 항원의 양과 항원의 존재를 측정하는 것 모두를 의미한다. 여기서 사용된 '정량하다'라는 용어는 샘플내 항원 또는 항체의 정량 측정 및 정성 측정 모두를 일컫는 것이라는 사실을 알아야 한다.

당업자들이라면 자명하게 알 수 있듯이 노출 1과 2에서 노출된 샘플의 두 부분표면이 동일한 것이 바람직한데, 그 이유는 이렇게 함으로써 노출 1에서 결합된 항원과 노출 2에서 결합된 항원사이의 원하는 차이를 부가적인 어떠한 오차의 근원없이 직접 얻을 수 있기 때문이다. 하지만 부분표본들의 양을 정확하게 안다는 전제하에, 각기 다른 부분표본, 즉 시험량이나 샘플의 양이 다른 부분표본을 가지고 이 방법

을 수행하는 것도 배제되지는 않는다. 또한, 시험하고자 하는 항원 샘플과 특이적 및 비특이적 항체를 동시에 두 고상에다 첨가하거나, 특이적 및 비특이적 항체를 첨가한후 항원 샘플을 두 웰속에 첨가할 수 있다는 것도 주목해야 한다.

본 발명에 따른 분석이 최적의 신뢰성을 갖기 위해서는, 두 고상에의 노출작업이 사실상 동일한 조건하에 실시되어야 한다. 이는 두 고상이 본질상 서로 동일하지만 고상에 본질상 동일한 항(anti)-항원-항체로 피막된 표면이 제공되기에 이론적으로 충분하다는 것을 의미한다.

'샘플속에 용해된 항체'라는 표현 혹은 이와 비슷한 표현들은, 바람직하게는 실제 샘플 또는 노출중 샘플속에 존재하거나 첨가된 항체가, 분석되고 있는 시험 물질속에서 본질적으로 가용성이라는 것을 뜻한다. 하지만 항원 검출이 이루어질때 그상이 고상으로부터 분리될 수 있다는 것을 전제로 이들이 고상위에 부동화되는 가능성도 배제되지는 않는다.

전술한 바와 같이 노출 1에서 존재하는 항체는 고상에 피막처리된 항체와 동일한 특이성을 갖는다. 원칙상 이는 항체가 검출하고자 하는 항원과 반응 또는 결합하며 항원이 고체위의 항체와 반응하는 능력을 통쾌한다는 것을 의미한다.

이와는 대조적으로 노출 2에서 존재하는 항체는 문제시되는 항원에 대하여 비특이성을 나타낸다. 즉 이들은 항원과 반응하거나 결합하지 않는다. 하지만 그외에는 이들이 노출 1에서 존재하는 항체와 본질적으로 동일해야 하는데, 이는 이들이 동일한 근원(동일한 동물종)에서 유래되며 본질적으로 동일한 방법으로 제조된다는 것을 의미한다. 그러나 이점에 있어 '동일하다'는 표현에 합리적인 해석을 내려야 하는데, 그 이유는 항체들이 본 발명과 전혀 무관한 어떤 방식으로 '동일한'것이 아니면 본 발명의 개념은 상실되지 않을 것이기 때문이다.

노출 1중에 결합된 항원과 노출 2중에 결합된 항원사이의 차에 의하여 항원을 검출하는 것 외에도, 당업자들에게 공지된 과정에 따라 이러한 검출작업을 수행한다. 따라서 검출과정에 관한 상세한 발명이 본 명세서에 기재될 것이다.

항원 검출을 위한 본 발명의 방법은 생물학적 샘플내 항원 t-PA(조직 플라스미노겐 활성화제)의 검출에 있어 특별한 관심을 끈다. 그러한 생물학적 샘플의 예로써 혈장, 혈액, 뇌척수액, 정액 또는 세포 배양 배지를 들 수 있다.

본 발명의 방법중에 특히 바람직한 실시형태에는, 고상으로 되어 있는 장치, 예컨대 시험관 또는 평판위에 먼저 항체를 집어 넣어, 가용성 항체가 실제 샘플 첨가시관 또는 웰의 안쪽 표면위에 미리 위치하고 있도록 해주는 것이 포함된다. 이러한 방법에서 본 발명이 실제적이고 경제적으로 유리한 방식으로 이용되는 동시에 신뢰할만한 결과가 얻어진다.

본 발명의 설명에서 거론된 고상은 비이드와 같은 입자일 수도 있다. 입자 조성의 비제한적인 예에는 아가로스, 폴리스티렌, 라텍스 및 폴리메타크릴레이트가 있다. 입자의 형태는 어떠한 것이라도 좋다.

본 발명의 특히 바람직한 실시형태에 있어서, 먼저, 문제시되는 장치 부피의 5-95%에 상당하는 부피의 항체를 첨가해준다. 항체의 부피가 장치 부피의 10-90%에 상당하는 것이 바람직하다. 항체의 부피가 장치 부피의 20-80%에 상당하는 것이 보다 더 바람직하다.

노출 1 또는 노출 2중에 각각 존재하는 항체의 양에 관해 말하자면, 적합한 농도 간격은 약 1-100mg/l인 것으로 밝혀졌다. 그러나 본 발명이 이러한 범위에 한정되는 것은 아니다. 바람직한 범위는 20-80m/l이다. 항체 농도의 범위는 수행중인 특정 분석에 따라 좌우된다는 것을 알아야 한다. 그러나 생물학적 샘플내에서 t-PA를 전술한 바와 같이 측정하는데 특히 적합한 범위는 약 1-100이다.

본 발명을 일반적으로 항원 검출과 관련하여 기술하고 설명하였으나, 본 발명의 방법은 바로 반대의 반응, 항체 검출용으로도 이용될 것이다. 다시 말해서 항체 검출 역시 본 발명의 범주내에 드는 것이다.

보다 더 구체적으로, 본 발명의 방법은 항체에 대하여 측정하고자 하는 샘플을 그 항체에 특이성이 있는 항원으로 피막처리된 고상에다 노출시킨후 결합된 항체를 공지의 방법으로 측정하는 면역학적 고상 방법에 의하여 항체를 검출하는 것에 관한 것이다.

본 발명에 따라서 그릇되게 높거나 그릇되게 포지티브한 결과를 극복하기 위하여, 측정하고자 하는 항체가 들어있는 샘플의 두 부분표본(이들의 크기가 동일한 것이 바람직함)을 동일한 항원으로 피막된 두 고상에다 노출시키되, 하나의 노출작업(노출 1)은 고상에 피막처리된 항원과 동일한 특이성을 갖는 항원이 부분표본속에 용해된 채 존재하는 가운데 실시하고 또다른 노출작업(노출 2)은 문제시되는 항체에 대하여 특이성을 갖지 않는 항원이 부분표본속에 용해된 채 존재하는 가운데 수행된다. 그밖에, 노출 2에서의 항원의 구조는 노출 1의 부분표본속에 용해된 항원의 구조와 유사해야 한다. 항체는 노출 1에서 결합된 항체와 노출 2에서 결합된 항체와의 차에 의해 검출한다. 이 방법은 체액내 HTLV III-특이성 항체(HIV AIDS 비루스-특이성)를 검출하는데 사용될 수 있다. 본 발명에 의해 측정될 수 있는 다른 항원-특이성 항체의 비제한적인 예로써, 카르디올리핀, 포스파티딜콜린, 콜라겐, A형간염 항체, B형간염 항체 및 보렐리아가 있다.

일반적으로 본 발명의 방법은 하기 과정에 따라 실시된다: 1-100mg/l의 항체와 0.1-1.0몰/l의 NaHCO_3 를 함유한 용액 100-1000 μl 을 20-30 $^\circ\text{C}$ 하에 2-4시간동안 온화하게 진탕하면서 평판의 웰속에서 배양함으로써 마이크로역가 평판을 항체로 피막처리해준다. 이러한 피막처리공정에 사용될 수 있는 완충액의 비제한적인 예에는, 트윈 20, 트리톤 X-100, 플루로닉 계면활성제와 같은 단백질 비-변성 세제를 함유한 단백질 비-변성 완충액, 예컨대 인산염으로 완충시킨 염수(PBS)트윈 또는 EDTA를 함유한 PBS 트윈이 있다.

웰을 비우고 내용물들을 PBS 트윈으로 세척한다.

각각의 샘플에 대하여 두 웰을 충전시키되, 한 웰속에는 5-15mg/ml의 정상 항체 100-200 μl 을, 다른 한

웰속에는 5-15mg/ml의 특이적 항체 100-200 μ l을 충전시킨다(둘다 PBS 트윈속에 용해시킴). 이와는 달리, 완충액이 EDTA를 함유한 PET 완충액일 수 있다. PET 완충액을 사용하는 경우에는 다음에 기술되는 산성화과정이 필요치 않다.

혈액샘플을 통상의 방법으로 수거하고 몇분간 1000-3000xg로 원심분리시킨다. pH 3.5-4.5인 초산나트륨 완충액 같은 산성화 완충액 1부피와 함께 혈장 약 1부피를 10-20분간 20-30 $^{\circ}$ C하에 배양함으로써 혈장을 산성화한다. pH 8-11인 인산나트륨-Tris같은 pH-조절용 완충액 1부피를 첨가함으로써, 산성화된 혈장을 중화시킨다.

각 혈장 샘플로부터 얻은 20-50 μ l의 부분표본을 PBS 트윈내에 용해시킨 5-15mg/l의 농도로 하여 각각 정상 또는 특이적 항체로 미리 충전시킨 웰속에 집어넣는다. 샘플을 조심스럽게 진탕하면서 20-30 $^{\circ}$ C에서 4-5시간동안 배양한다.

웰속의 내용물들을 비우고 PBS 트윈으로 세척한다.

PBS 트윈속에 용해된 1-3mg/l의 HRP-접합 항체 100-300 μ l 부분표본을 웰속에서 20-30 $^{\circ}$ C하에 4-5시간동안 배양한다.

웰속의 내용물들을 비우고 PBS 트윈 혹은 EDTA를 함유한 PBS 트윈으로 세척한다.

pH가 4-6인 구연산염-인산염 완충액속에 용해된 과산화효소 기질 100-300 μ l 부분표본을 어두운 가운데 20-40분간 20-30 $^{\circ}$ C의 웰속에서 배양한다.

4-5몰/l의 H₂SO₄ 10-100 μ l을 첨가함으로써 기질 반응을 중단시킨다.

490-495nm에서의 흡수율을 기록한다. 정상 항체로 충전된 웰과 특이적 항체로 충전된 웰사이의 흡수율 차를 각각 혈장 샘플을 대상으로 계산한다. 이것은 반응의 항원-특이성 부분을 나타내준다: 이를 항원이 정상 혈장속에 희석된 표준 곡선과 비교한다.

하기의 구체적인 실시예는 특히 조직 플라스미노겐 활성화제의 측정시에 적용되는 본 발명을 예증해 준다. 당 업자에게는 이외의 다른 실시예들도 가능할 것이며 본 발명이 이러한 구체적인 예시적 실시예에 국한되지는 않는다는 것을 알아야 한다.

[실시예 1]

다음에 나와 있는 것들은 본 실시예에서 사용된 단백질 성분, 덜 통상적인 화합물질 및 완충액에 관한 설명이다.

염소의 항-t-PA IgG는 인간 자궁으로부터 얻는 t-PA에 대항하는 항혈청으로서, 염소에서 생산된다. IgG 분류물은(fraction) A-세파로스 단백질상에서 크로마토그래피에 의하여 정제한다. 이 제재를 동결건조시키고, 사용시에는 물속에 넣어 복원시킨다.

정상 염소 IgG: 면역시키지 않은 염소의 혈청으로부터 얻은 IgG 분류물을 A-세파로스 단백질 상에서 크로마토그래피에 의하여 정제한다. 이 제재를 동결건조시키고, 사용시에는 물속에 넣어 복원시킨다.

양고추냉이 과산화효소 접합 염소 항-t-PA IgG: 염소의 항-t-PA IgG(전술한 것)를 글루타르알데히드법에 의하여 양고추냉이 과산화효소(HRP 시그마 VI 유형)에 접합시킨다. A-세파로스 단백질상에서 크로마토그래피시킴으로써 접합체를 유리 과산화효소로부터 정제한다.

조직 플라스미노겐 활성화제(t-PA)는 단일 사슬형태로서, 인간의 흑색종 세포로부터 얻어지며 소의 혈청 알부민을 담체로서 갖는 동결 건조 제제이다.

1,2-페닐렌디아민(O.P.D)는 머르크 캐미칼사(뉴저지주 라웨이시)로부터 입수하는 합성질의 과산화효소 기질이다.

PBS-트윈 완충액은 20mM/l 인산나트륨 완충액, 100mmol/l NaCl, 0.1g/l 트윈 20, pH 7.4.

PET 완충액, 20mmol/l 인산나트륨 완충액, 100mmol/l NaCl, 10mmol/l EDTA, 0.1g/l 트윈 20, pH 7.9.

구연산염-인산염 완충액, 100mM/l의 인산 이수소나트륨을 100mM/l의 구연산을 사용하여 pH 5.0으로 조절한다.

산성화 완충액, 1.0M/l의 초산나트륨 완충액, pH 3.9.

pH 조절용 완충액, 50mM/l의 인산나트륨, 500mM/l의 트리스(트리스-히드록시메틸아미노메탄), pH 10.4.

본 실시예에서 사용된 ELISA 방법론은 베르그스도르프일행의 1983년도 문헌[Thromb.Haemostas., 50(3), 740-744]에 나와 있는 방법을 근거로 한 것이다.

혈장내 t-PA 항원 농도의 측정은 다음과 같이 실시한다: 평판의 웰속에서 10mg/l의 항 t-PA IgG와 0.1몰/l의 NaHCO₃가 들어있는 200 μ l의 용액을 조심스럽게 진탕하면서 25 $^{\circ}$ C에서 3시간동안 배양함으로써 96개의 웰이 있는 마이크로시험 평판(Nunc 면역평판 1, Nunc, 덴마크)을 항 t-PA IgG로 피막처리한다.

웰을 비우고 내용물들을 PBS 트윈 또는 PET 완충액으로 세척한다.

각 샘플에 대하여 두 웰을 충전시키되, 한쪽 웰에는 10mg/ml의 정상 IgG 150 μ l을, 다른쪽 웰에는 10mg/ml의 항-t-PA IgG 150 μ l을 충전시킨다(둘다 PBS 트윈속에 용해시킴).

혈액 샘플을 통상의 방법으로 수거하고(구연산나트륨 또는 EDTA) 2000xg에서 5분내에 원심분리한다. 혈

장 1부피와 산성화 완충액 1부피를 25°C에서 15분간 배양함으로써 혈장을 산성화한다. 산성화된 혈장을 pH-조절용 완충액 1부피를 첨가함으로써 중화시킨다. 이 과정에서 PET 완충액이 사용되면, 혈장의 산성화는 필요치 않다.

각 혈장 샘플로부터의 20-50 μ l 부분표본(샘플내 t-PA 함량에 의거; 측정 결과는 이 범위내의 첨가 부피와는 무관함)을 PBS 트윈속에 용해된 10mg/l의 농도로, 각각 정상 또는 항-t-PA IgG가 미리 충전되어 있는 웰속에다 집어 넣는다. 샘플을 조심스럽게 진탕하면서 25°C하에 3시간동안 배양한다.

웰속의 내용물들을 비우고 PBS 트윈 또는 PET 완충액으로 세척한다.

PBS 트윈 또는 PET 완충액속에 용해된 HRP-접합 t-PA IgG(2mg/l)의 200 μ l 부분표본을 웰속에서 25°C하에 3시간동안 배양한다.

웰의 내용물들을 비우고 PBS 트윈으로 세척한다.

pH 5.0인 구연산염-인산염 완충액 속에 용해된 기질(O.P.D./H₂O₂)의 200 μ l 부분표본을 25°C하에 30분간 어두운중에 웰속에서 배양한다.

4.5ML/l의 H₂SO₄ 50 μ l을 첨가함으로써 기질반응을 차단시킨다.

492nm에서의 흡수율을 기록한다.

정상 IgG로 충전된 웰과 항-t-PA IgG로 충전된 웰의 흡수율 차이를, 각 혈장 샘플을 대상으로 하여 계산한다. 이것은 이 반응의 t-PA-특이성 부분을 나타낸다; 이것을 t-PA가 정상인간혈장속에서 희석되어 있는 표준곡선과 비교한다.

[실시에 2]

ELISA 방법론을 사용하여 t-PA 항원 농도를 측정할 경우, 비특이적인 결합 효과로 인해 얻어진 부정확한 결과를 교정하기 위한 방법의 필요성을 조사하기 위해서 다음과 같은 실험을 실시한다.

34명의 환자로부터 얻은 혈장 샘플을 ELISA에 의하여 분석한다. 샘플을 PBS 트윈, 정상 IgG 또는 항-t-PA IgG로 충전된 웰속에 집어넣는다.

결과는 제1도에 나와 있다. 정상 IgG로 충전된 웰속에 들어있는 샘플은 PBS 트윈으로 충전된 웰속에 들어있는 샘플보다 훨씬 낮은 흡수율을 나타낸다. 31%의 경우에 있어서 (13/34)이 차이는 100 밀리 흡수율 단위이상이다. 각 샘플은 항-t-PA IgG의 존재하에서조차도 높은 흡수율을 나타낸다. 따라서, ELISA 기술(혹은 이와 유사한 기술)에 의한 항원 농도 측정중에 비특이적인 흡수로 인한 그릇되게 포지티브한 결과를 피하기 위해서, 정상 및 항-t-PA 항체를 사용한 본 발명의 방법론을 이용하는 것이 필요하다.

[실시에 3]

비특이적 결합을 많이 야기하는 혈장 샘플의 빈도수를 더 조사해보기 위하여, 519명의 개체로부터 유래된 샘플을 t-PA 농도에 관하여 분석한다. 혈장 샘플들을 전술한 바와 같이 항-t-PA IgG로 충전된 웰속에 집어 넣는다. 이들 웰을 '사전충전 A웰'이라고 칭한다. 이것은 '사전충전 A웰'에 상응될 것이다. 결과는 하기 표 1에 나와 있다.

[표 1]

본 발명에 의해서 t-PA 항원에 대하여 분석된, 519개의 혈장샘플로 사전충전 A 웰속에서 측정된 분석 반응(A492)	
A492	n
>75	454
75-100	46
101-125	10
126-150	6
>150	3

'n'은 샘플의 수이다. 정상 t-PA의 함량은 약 6 μ g/l인데, 이것은 이 분석 방법에서 약 200 밀리 흡수단위(mA)의 특이적 측정결과에 상당하는 것이다. 본 발명을 사용하지 않으면, 샘플의 약 2%내 항원 함량이 최소한 40%만큼 과대평가될 것이라는 사실이 표 1에 의해 입증된다. 임상적 연구에서, 샘플 1ml당 몇 ml 내의 심각한 측정 오차가 상당한 불확실성과 특별 작업을 만들어내는데 충분하리라는 것을 알아야 한다.

물론 상기한 것들이 단지 본 발명의 바람직한 실시형태에 관한 것이며 첨부된 청구범위에 상술된 바와 같은 본 발명의 정신과 범주내에서 여러가지의 개조와 변형이 가능하리라는 것을 알아야 한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

하기 단계(a)-(e)를 포함하는, 샘플내의 향원을 검출하는 개선된 방법:a. 첫번째 고상 및 두번째 고상을 향원-특이성 향체로 피막처리하고; b. 첫번째 고상을 첫번째 및 두번째 고상의 피막처리시에 사용된 것과 동일한 향원-특이성 향체 및 향원이 들어있는 용액에 노출시키고; c. 두번째 고상을 비-특이성 향체 및 향원이 들어있는 용액에 노출시키고; d. 첫번째 고상 및 두번째 고상에 결합된 향원의 양을 측정하고; e. 두번째 고상에 결합된 향원의 양에서 첫번째 고상에 결합된 향원의 양을 빼줌으로써 샘플내 향원의 양을 정량한다.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 b에서, 첫번째 고상을 먼저 향원-특이성 향체가 들어있는 용액에 노출시킨 후 향원-특이성 향체가 들어있는 그 용액에다 향원이 들어있는 용액을 첨가하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계 c에서, 두번째 고상을 먼저 비-특이성 향체가 들어있는 용액에 노출시킨 후 비-특이성 향체가 들어있는 그 용액에다 향원이 들어있는 용액을 첨가하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 향체가 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 비-특이성 향체 및 향원-특이성 향체가 동일한 종으로부터 유래되는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 첫번째 고상이 첫번째 시험관의 안쪽 표면이고, 두번째 고상이 두번째 시험관의 안쪽 표면인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 첫번째 고상이 마이크로 역가 평판내 첫번째 웰의 안쪽 표면이고, 두번째 고상이 마이크로 역가 평판내 두번째 웰의 안쪽 표면인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 고상이 입자의 표면인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 입자가 아가로스, 폴리스티렌, 라텍스 및 폴리메타크릴레이트로 이루어진 군에서 선택된 물질로 되어 있는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 향체가 면역글로블린을 포함하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 향원이 조직 플라스미노겐 활성화제 향원 또는 비노기 플라스미노겐 활성화제를 포함하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 방법이 정상 분석인 방법.

청구항 13

하기 단계(a)-(e)를 포함하는, 샘플내의 향원-특이성 향체를 검출하는 개선된 방법:a. 첫번째 고상 및 두번째 고상을, 시험하고자 하는 향체에 특이성이 있는 향원으로 피막처리하고; b. 첫번째 고상을 첫번째 및 두번째 고상의 피막처리시에 사용된 것과 동일한 향원 및 향원-특이성 향체가 들어있는 용액에 노출시키고; c. 두번째 고상을 비-특이성 향원 및 향원-특이성 향체가 들어있는 용액에 노출시키고; d. 첫번째 고상 및 두번째 고상에 결합된 향원-특이성 향체의 양을 측정하고; e. 두번째 고상에 결합된 향체의 양에서 첫번째 고상에 결합된 향체의 양을 빼줌으로써 샘플내 향체의 양을 정량한다.

청구항 14

제13항에 있어서, 단계 b에서, 첫번째 고상을 먼저 향원이 들어있는 용액에 노출시킨 후, 향원이 들어있는 그 용액에다 향원-특이성 향체가 들어있는 용액을 첨가하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 단계 c에서, 두번째 고상을 먼저 비특이성 향원이 들어있는 용액에 노출시킨 후 향원이 들어있는 용액에다 향원-특이성 향체가 들어있는 용액을 첨가하는 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 향체가 모노클로날 항체 및 폴리클로날 항체로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 비특이성 항원과 검출하고자 하는 항체에 대해 특이성이 있는 항원의 구조가 유사한 방법.

청구항 18

제13항에 있어서, 첫번째 고상이 첫번째 시험관의 안쪽 표면이고, 두번째 고상이 두번째 시험관의 안쪽 표면인 방법.

청구항 19

제13항에 있어서, 첫번째 고상이 마이크로 역가 평판내 첫번째 웰의 안쪽 표면이고, 두번째 고상이 마이크로 역가 평판내 두번째 웰의 안쪽 표면인 방법.

청구항 20

제13항에 있어서, 고상이 입자의 표면인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 입자가 아가로스, 폴리스티렌, 라텍스 및 폴리메타크릴레이트로 이루어진 군에서 선택된 물질로 되어 있는 방법.

청구항 22

제13항에 있어서, 항체가 면역글로블린을 포함하는 방법.

청구항 23

제13항에 있어서, 항원-특이성 항체가 HTLV III-특이성 항체를 포함하는 방법.

청구항 24

제13항에 있어서, 항원-특이성 항체가 AIDS 바이러스-특이성 항체를 포함하는 방법.

도면

도면1

